

Hereditär nefrit hos bullterrier i Sverige

Marika Gunnarsson

**Handledare: Astrid Hoppe
Inst. för kirurgi och medicin smådjur**

**Biträdande handledare: Maria Hurst
Inst. för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	3
SUMMARY	3
INLEDNING.....	4
Bakgrund.....	4
Syfte.....	5
LITTERATURÖVERSIKT	5
Nefronets struktur.....	5
Etiologi	7
Klinisk bild.....	7
Patogenes	8
Patologi	9
Diagnos	10
Behandling	10
MATERIAL OCH METODER	10
Hundar	10
Undersökning av urinprover	12
Histopatologisk undersökning.....	13
Transmissionselektronmikroskopi.....	13
RESULTAT	14
Proteinuri	14
Urindensitet.....	15
Histopatologi.....	15
Ultrastruktur.....	18
DISKUSSION	20
Slutsats.....	22
LITTERATURFÖRTECKNING	23
TACK	25

SAMMANFATTNING

Hereditär nefrit hos bullterrier orsakas av en mutation som leder till att kollagen typ IV, vilket är en viktig komponent i basalmembran, inte bildas på ett normalt sätt. Mutationen nedärvs autosomt dominant hos bullterrier och progression till total njursvikt sker efter varierande lång tid, från flera månader till tio år.

Proteinuri är det första kliniska tecknet på sjukdomen och diagnosen ställs genom transmissionselektronmikroskopi av njurvävnad där man ser typiska ultrastrukturella förändringar på det glomerulära basalmembranet (GBM), förtjockning och lamellering.

Den här studien genomfördes för att ta reda på förekomsten av hereditär nefrit hos bullterrier i Sverige genom undersökningar av urinprover och njurvävnad samt jämförelser med hur sjukdomen beskrivits i litteraturen. Urinprover från 76 svenska bullterriers samlades in och analyserades avseende proteininnehåll. Hundar i lopp och dräktighet uteslöts. Tre hundar hade persisterande proteinuri vilket definierades som en urinprotein/kreatininkvot $>0,5$ i minst två provtagningar med minst en månads mellanrum, och en av dessa blev aktuell för njurbiopsi.

Tidigare insamlad njurvävnad för ljusmikroskopi och transmissionselektronmikroskopi från nio bullterriers som avlivats/självdött på grund av njursjukdom bedömdes också. De ljusmikroskopiska fynden är ospecifika och inte diagnostiska vid hereditär nefrit men de fynd som tidigare beskrivits kunde även hittas i snitten från de bullterriers som ingick i studien. Vanliga förändringar var kvarstående fetala glomeruli (hos vuxna hundar), förstörade glomeruli, adhesioner mellan kapillärer och Bowmans kapsel, ökning av mesangiellt matrix, förtjockade och mineraliserade basalmembran, skleroserade glomeruli, periglomerulär fibros, cystiskt dilaterade Bowmans kapslar med atrofierade glomeruli samt proteininnehåll i tubuli. De ultrastrukturella fynden överensstämde också med de som angivits som specifika i litteraturen, det vill säga förtjockning och lamellering av GBM. Dessa GBM-förändringar sågs hos alla de sju hundar som kunde bedömas med elektronmikroskopi.

Resultaten tyder på att hereditär nefrit förekommer hos bullterrier i Sverige och att sjukdomen kan diagnosticeras med hjälp av klinisk bild och ljusmikroskopi tillsammans med transmissionselektronmikroskopi. Prover från ett större antal hundar och framförallt från misstänkta familjer skulle ytterligare öka kunskapen om utbredningen av hereditär nefrit hos bullterrier i Sverige.

SUMMARY

Bull terrier hereditary nephritis is caused by a mutation that leads to an inadequate synthesis of collagen type IV, which is an important component in the basement membranes. The inheritance of the mutation is autosomal dominant in bull terriers and progression to renal failure takes variable time, from several months to ten years.

Proteinuria is the first clinical sign of the disease and the diagnosis is confirmed by transmission electron microscopy of renal tissue where typical ultrastructural changes in the glomerular basement membrane (GBM), thickening and multilaminar splitting are found.

This study was performed in order to find out the occurrence of hereditary nephritis in bull terriers in Sweden through examination of urine samples and renal tissue and comparisons with how the disease is described in the literature. Urine samples from 76 Swedish bull terriers were collected and examined for proteinuria. Dogs in heat or pregnancy were excluded. Three dogs had persistent proteinuria which was defined as a urinary protein creatinine ratio $>0,5$ in at least two urine samples taken at least one month apart, and in one of them a renal biopsy was performed.

Renal tissue for light and transmission electron microscopy from nine bullterriers that had been euthanized/died earlier because of renal disease were also evaluated. In accordance with earlier studies the light microscopic changes found were non-specific and not diagnostic. Common lesions were fetal glomeruli (in adult dogs), larger glomerular tufts, adhesions between capillaries and Bowmans capsule, mesangial thickening, thickened and mineralized basement membranes, glomerular sclerosis, periglomerular fibrosis, cystic dilatation of Bowmans capsules with glomerular atrophy and protein content in the tubules. The ultrastructural abnormalities corresponded well to those described as specific for hereditary nephritis in earlier studies, including thickening and multilaminar splitting of the GBM. These changes in the GBM were seen in all the seven dogs that could be evaluated with electron microscopy.

The results suggest that hereditary nephritis occurs in the bull terrier breed in Sweden and that the disease can be diagnosed by clinical symptoms and light microscopy together with transmission electron microscopy. Urine specimens from a greater number of dogs, especially from suspected families, would further increase the knowledge about how widespread hereditary nephritis amongst bull terriers is in Sweden.

INLEDNING

Bakgrund

Hereditär nefrit är en ärftlig njursjukdom som orsakas av en defekt syntes av kollagen typ IV och som förekommer hos hund såväl som hos människa (Lees, 1996). Hos människa kallas sjukdomen Alports syndrom och förutom försämrad njurfunktion ses hos människa även missbildningar i ögon och dövhet (Hood et al, 1995). Hereditär nefrit hos hund har beskrivits hos raserna bullterrier, samojed (där sjukdomen kallas hereditär glomerulopati) (Grodecki et al, 1997), engelsk cockerspaniel (Lees et al, 1998) och dalmatiner (Hood et al, 2002b).

Sjukdomen drabbar basalmembran, där kollagen typ IV är en viktig komponent, och då framförallt njurens glomerulära basalmembran (GBM) (Lees et al, 1999). Nedärvningen av hereditär nefrit kan vara könsbunden dominant, autosomal recessiv eller autosomal dominant. Hos bullterrier nedärvs mutationen autosomt

dominant (Hood et al, 1990) och bullterrier har använts som en djurmodell för autosomal dominant Alports syndrom hos människa (Hood et al, 2002a).

Ett av de första kliniska tecknen på sjukdomen är proteinuri (Hood et al, 1990). Progressionen av sjukdomen går olika snabbt hos olika hundraser och hos bullterrier har man sett en stor variation, från några månader till tio år (Hood et al, 1995), innan hunden måste avlivas eller dör på grund av total njursvikt. Identifiering av de typiska förändringarna i GBM via transmissionselektronmikroskopi är nödvändig för att ställa diagnosen hereditär nefrit.

Sjukdomen är så utbredd inom bullterrierrasen i Australien att man i de studier som gjorts där inte vågat använda bullterrier som friska kontroller utan valt hundar av annan ras (Hood et al, 2002a). Svenska bullterrierklubben har uppmärksammat sjukdomen då hundar i varierande åldrar under åren dött/avlivats på grund av kronisk nefrit. Klubben uppmanar därför sedan flera år till undersökning av urinprov, framförallt från avelshundar, och man har sett att proteinuri förekommer men man har inte utrett i vilken omfattning.

Syfte

Hereditär nefrit är en ärftlig och dödlig sjukdom som man vet har hög prevalens inom bullterrierrasen i Australien (Hood et al, 1990). Inga studier av sjukdomen är hittills gjorda i Sverige.

Syftet med denna studie var således att få kunskap om förekomsten av hereditär nefrit i Sverige genom att undersöka prevalensen av proteinuri hos svenska bullterriers. Proteinuri betraktas som ett av de tidigaste tecknen på sjukdomen (Hood et al, 1990).

Syftet var också att undersöka om de diagnostiska kriterier som tidigare beskrivits av bland andra Hood et al, 2002a kan tillämpas här. Detta gjordes genom att studera och beskriva morfologiska förändringar som hittas i njurvävnad med hjälp av ljus- och transmissionselektronmikroskopi. Därefter jämfördes dessa med de i litteraturen beskrivna förändringarna. Av särskild vikt var att ta reda på om de specifika ultrastrukturella förändringarna, i framförallt GBM, som beskrivits i litteraturen (Hood et al, 2000) förekommer hos svenska bullterriers som avlivats på grund av njursvikt eller har persisterande proteinuri.

LITTERATURÖVERSIKT

Nefronets struktur

Glomeruli

En glomerulus är en del av nefronet, njurens funktionella enhet, och består av ett kapillärnystan som hålls ihop av ett mesangium av stödjeceller i ett glykoproteinmatrix. Kapillärnystanet utlinjeras av epitelceller, podocyter, med speciella så kallade fotutskott. Nystanet är beläget inuti en Bowmans kapsel, ett membranöst hölje som utlinjeras av plattepitelceller. Blod filtreras genom glomeruli och blir ett ultrafiltrat av plasma, primärurin, som passerar mellan glomerulis epitelceller in i Bowmans kapselutrymme och sedan vidare in i proximala tubuli (McGavin et al, 2001). Mellan glomerulikapillärernas

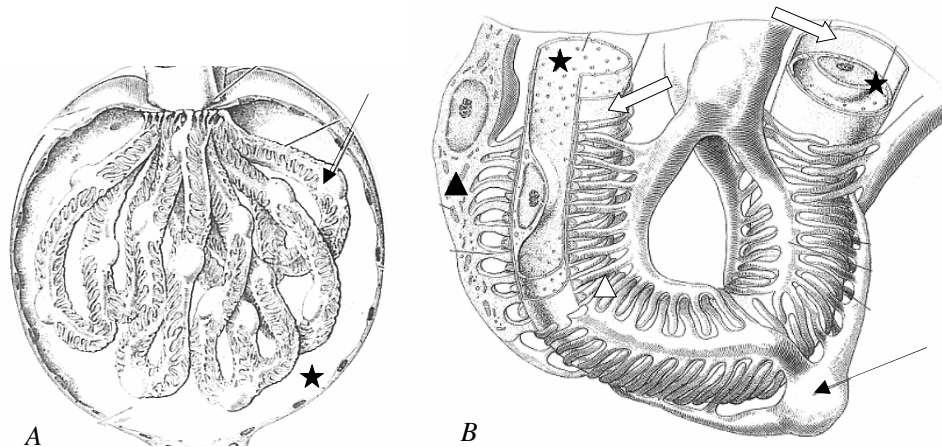
fenestrerade endotelceller och podocyterna finns det basalmembran, GBM, som separerar blodet i kapillärerna från utrymmet med primärurin i Bowmans kapsel. (Figur 1) Det glomerulära basalmembranet är cirka 0,1 mikrometer tjockt och bildas genom fusion av kapillärernas och podocyternas basallaminae (Junqueira et al, 1998). Podocyterna som sitter emot basalmembranets yttre lager svarar för syntes av komponenter till basalmembranets uppbyggnad och deras fotutskott är inbäddade i det tunna, yttre lagret av basalmembranet (McGavin et al. 2001). Basalmembranet har därutöver ett tätt centralt lager, lamina densa, samt ett tunt inre lager. Basalmembranets lamina densa består förutom glykoproteinet laminin av två olika nätverk av kollagen typ IV i ett negativt laddat matrix av proteoglykanen heparansulfat vilket gör att GBM blir ett selektivt filter för makromolekyler (Junqueira et al, 1998).

Kollagen typ IV

Varje kollagen IV-monomer är en trippelhelix av så kallade α -kedjor och sex olika α -kedjor har identifierats (Lees, 1996). I GBM finns två olika nätverk av kollagen typ IV; det ena med $\alpha 1$ - och $\alpha 2$ -kedjor och det andra med $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, och $\alpha 5$ -kedjor. Det andra nätverket är tätare och tros bidra till basalmembranets stabila struktur (Chen et al, 2003).

Proteinläckage

Endotelet med dess fenestreringar, basalmembranets nätverksstruktur med ingående glykoproteiners laddning samt filtrationsöppningarna mellan fotutskotten utgör tillsammans glomerulis filtrationsbarriär. Skada på denna barriär kan orsaka ökad permeabilitet och proteinuri på grund av att proteinläckaget, framförallt albumin, överstiger tubulis reabsorptionsförmåga och protein följer därför med ut i urinen. (McGavin et al, 2001)



Figur 1. A. Glomerulus. Podocyternas fotutskott täcker yttre ytan av kapillärerna och den delen av podocyten som innehåller kärnan buktar ut (pil) i Bowmans kapselutrymme (stjärna) där primärurinen är. B. Glomerulikapillär. Podocyter (svart pil) omger kapillären som har fenestrerat endotel (stjärna). Cellerna vilar på ett kontinuerligt basalmembran (vit pil). Till vänster i figuren ses en podocyt i genomsnitt (svart triangel). Podocyternas fotutskott (vit triangel) är i kontakt med basalmembranet och mellan fotutskotten finns filtrationsöppningar (Junqueira et al, 1998).

Etiologi

Sjukdomen antas vara av monogen typ, det vill säga att ett enda genlokus har full penetrans, eftersom ungefär lika många tikar som hanar är drabbade och man har inte sett att någon generation har hoppats över. Hereditär nefrit hos bullterrier orsakas således av en mutation med autosomal dominant nedärvning (Hood et al, 1990). Det är den enda formen av nedärvning där överföring av sjukdom sker från far till son (Hood et al, 2002b).

Sjukdomen hos dalmatiner nedärvs på samma sätt (Hood et al, 2002b) medan den hos samojed är könsbunden (Grodecki et al, 1997) och hos engelsk cockerspaniel antingen könsbunden (Lees et al, 1997) eller autosomalt recessiv (Lees et al, 1998). Även om dalmatiner korsades in i bullterrierrasens begynnelse (Hägglund, 2001) anses drabbade dalmatiner och bullterrier härröra från olika förfäder i respektive ras och troligen rör det sig om två olika mutationer (Hood et al, 2002b). De flesta bullterrier med hereditär nefrit har släktskap med en enda hund och mutationen är identisk hos alla drabbade avkommor (Hood et al, 1995).

Den onormala genen kodar sannolikt inte för $\alpha 5$ -kedjan då genen för $\alpha 5$ -kedjan sitter på x-kromosomen. Det onormala GBM som ses hos hanhundar av raser med könsbunden hereditär nefrit saknar Goodpasture- och Alport-antigenerna, vilka representerar delar av $\alpha 3$ - respektive $\alpha 5$ -kedjorna. Med hjälp av monoklonala antikroppar och Goodpastureserum har man däremot sett att Goodpastureantigenet finns i GBM hos sjuka bullterriers. Mutationen vid autosomal Alports syndrom hos människa har visat sig drabba genen för $\alpha 3$ -kedjan men eftersom Goodpastureantigenet finns kvar hos bullterrier med hereditär nefrit är det mindre troligt att mutationen sitter där hos denna hundras. $\alpha 4$ -kedjan skulle istället kunna vara den som drabbas av mutationen. (Hood et al, 1995)

Klinisk bild

Proteinuri ses hos drabbade hundar och en förhöjd urinprotein/kreatininkvot indikerar subklinisk sjukdom. Alla hundar med sjukdomen har en urinprotein/kreatininkvot på $\geq 0,3$ (Hood et al, 1995). Hos bullterrier har det på senare tid visat sig att det är tubuliatrofi och interstitiell fibros som bäst motsvarar den förhöjda urinprotein/kreatininkvoten (Hood et al, 2002a), dock har tidigare studier visat att det är de glomerulära förändringarna som korrelerar bäst med kvoten (Hood et al, 1991). Man har även sett att graden av proteinuri korrelerar bättre med glomeruliskadan än med stadiet av njursjukdom (DiBartola et al, 1980). Vid den autosomalt dominant nedärvda formen av Alports syndrom kan man även se hematuri både när njurfunktionen är normal och vid progressiv försämring av njurfunktionen till njursvikt (Ciccarese et al, 2001).

Hereditär nefrit hos bullterrier progredierar till njursvikt och död på alltifrån några månader upp till tio år (Hood et al, 1995). Som jämförelse kan nämnas att samojeder med könsbunden hereditär nefrit utvecklar njursvikt inom det första levnadsåret (Valli et al, 2001). Hur snabbt sjukdomen fortskrider hos bullterrier är svårt att förutsäga då man inte sett någon korrelation mellan överlevnadstid och de biokemiska parametrarna vid den första undersökningen (Cook et al, 1996).

Angående eventuell associerad hörselnedsättning finns det motsägelsefulla uppgifter i litteraturen. I en studie anser man att hörselnedsättning är vanligt (Hood et al, 2002a), medan man i en annan menar att dövhet inte hör till sjukdomsbilden hos bullterrier, eftersom dövhet även förekommer hos friska hundar (Hood et al, 1995). Den ögonmissbildning som associerats med hereditär nefrit består av att linsen får en konisk utvidgning i främre barken och eventuellt ses även fläckar på näthinnan (Blaise et al, 2003). En liknande missbildning av linsen har beskrivits i ett fåtal fall av hereditär nefrit hos bullterrier, medan skador på näthinnan inte otvetydigt kunde identifieras på grund av hundarnas naturligt prickiga ögonbotten (Hood et al, 1995). I en ultrastrukturell studie av drabbade bullterriers kunde dock inga förändringar påvisas i ögat (Hood et al, 2002a).

Hos bullterrier med kronisk njursvikt ses typiskt slöhet, anorexi, polyuri, polydipsi och avmagring. Azotemi, förhöjt serumfosfat och kolesterol samt proteinuri ses också. Urindensiteten är vanligen låg, 1,011-1,017 (Robinson et al, 1989). Många har hematuri. Man har inte sett onormalt stora trombocyter som finns hos människor med autosomt nedärvt Alports syndrom (Hood et al, 1995) och inte heller anemi som ses vid kronisk interstitiell nefrit (Wright, 1976).

Patogenes

Normal glomeruliutveckling involverar ett byte av kollagen typ IV-nätverk, från mest $\alpha 1$ - och $\alpha 2$ -kedjor till mer $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -kedjor. Hos hundar med den könsbundet nedärvda sjukdomen ser man $\alpha 1$ - och $\alpha 2$ -kedjor men inga $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -kedjor. $\alpha 1$ - och $\alpha 2$ -kedjorna är följaktligen nödvändiga för normal glomeruliutveckling och $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -kedjorna är nödvändiga för glomerulis långsiktiga struktur och funktion (Harvey et al, 1998). Troligen ger avsaknaden av kollagen IV-kedjorna $\alpha 3$, $\alpha 4$ och $\alpha 5$ en svagare struktur än normalt och GBM försvagas även progressivt, då det kontinuerligt exponeras för det normala trycket från den glomerulära filtrationen. Försvagningen visar sig ultrastrukturellt som lamellering som gradvis ökar med tiden. Man har även sett att GBM vid Alports syndrom är mer känsligt för proteolytisk nedbrytning (Chen et al, 2003). Läckage av plasmaproteiner, framförallt albumin, genom kapillärväggarna i glomeruli orsakar persisterande proteinuri vilket är ett kliniskt kännetecken för en glomerulär skada (Grauer, 2005). Persisterande proteinuri associeras också med de progredierande skadorna i glomeruli och tubuliinterstitiellt och även den följande förlusten av ytterligare nefron.

Molekyldefekterna som ligger bakom hörselnedsättningen vet man inte mycket om, men det har visats att $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -nätverket även saknas helt på en specifik plats i cochlea hos sjuka individer. Troligen leder detta till minskad spänning i basalmembranet och därmed sjunker förmågan att höra högfrekventa ljud. (Harvey et al, 2001)

När det gäller ögonmissbildningarna har man sett att förlusten av $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -kollagenmolekylerna i basalmembranen orsakar ett onormalt ultrastrukturellt utseende och en sämre stabilitet vilket alltså även drabbar näthinnan och linskapseln. Vid Alports syndrom hos människa har observerats att skadorna förvärras med tiden och näthinneskadorna syns ofta samtidigt som njursvikt utvecklas. (Colville et al, 1997)

Patologi

Makroskopiskt har man sett att njurarna hos bullterrier med kronisk njursvikt är förminskade (två tredjedelar av normal storlek), har fast konsistens, blek bark och granulerad yta (Robinson et al, 1989). Cystiska förändringar förekommer också, vilket är en skillnad gentemot den könsbundna formen av Alports syndrom (Hood et al, 1995).

Histopatologi

Vid Alports syndrom och hereditär nefrit ses ofta utbredda histopatologiska förändringar i både glomeruli och den tubulointerstitiella vävnaden, men förändringarna är ospecifika och inte diagnostiska för sjukdomen. Hos sjuka bullterriers är de vanligaste förändringarna avseende glomeruli kvarstående fetala glomeruli (hos vuxna hundar), förstörade glomeruli, adhesions mellan kapillärer och Bowmans kapsel, ökning av mesangiellt matrix, förtjockade och mineraliserade basalmembran, skleroserade glomeruli, periglomerulär fibros samt cystiskt dilaterade Bowmans kapslar med atrofierade glomeruli. Även ett minskat antal glomeruli har noterats. I tubuli ses dilatation, hyperplastiskt eller atrofiskt tubuli-epitel samt förtjockade och mineraliserade basalmembran. Multipla cystor, radiär fibros, fokal infiltration av mononukleära inflammatoriska celler och arterioskleros är andra vanligt förekommande lesioner. (Hood et al, 1991, 1995, 2000, 2002a)

En studie har beskrivit följande histologiska fynd vid kronisk njursvikt utan specificerad orsak hos bullterrier; utbredd nefronförlust, diffus interstitiell fibros, fokal radiär fibros, utbredd tubulidilatation med fokal mineralisering av tubuli-epitelet och angränsande basalmembran. Glomeruli var ofta atrofiska med segmentell fibros och många hade förtjockade basalmembran. Vissa Bowmans kapslar var kraftigt dilaterade. (Robinson et al, 1989)

De cystiska förändringarna vid hereditär nefrit liknar inte cystanjurar (polycystic kidney disease) eftersom njurarna vid hereditär nefrit generellt är små, fasta och fint granulerade (Hood et al, 1995). Upprepade njurbiopsier tagna med flera års mellanrum visar heller ingen progressiv cystbildning. Hos bullterrier kan dock polycystic kidney disease, där cystorna har ursprung från nefron eller uppsamlingsgång, och hereditär nefrit med de specifika ultrastrukturella GBM-skadorna förekomma samtidigt (O'Leary et al, 2002).

Ultrastruktur

Det specifika morfologiska fyndet vid hereditär nefrit är en utbredd lamellering av GBM vilket är en ultrastrukturell förändring som endast kan ses med hjälp av transmissionselektronmikroskopi. Dessa skador utvecklas progressivt och kan detekteras elektronmikroskopiskt innan några förändringar hittas med ljusmikroskopi (Lees, 1996). Hundar i tidigt stadium har mindre framträdande ultrastrukturella förändringar (Hood et al, 2002b).

I en studie misstänktes att de ultrastrukturella förändringarna i GBM, lamellering och förtjockning, kunde höra ihop med $\alpha 1$ - och $\alpha 2$ -kedjornas ökade uttryck i GBM som saknar tillräcklig mängd $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -kedjor (Lees et al, 1999).

Dock ses samma lamellering och förtjockning av basalmembranet även vid den autosomalt dominant formen hos bullterrier där $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - och $\alpha 5$ -kollagenkedjorna har påvisats i GBM med hjälp av immunohistokemisk undersökning (Hood et al, 2002a).

Typiska förändringar utöver lamellering anses vara uppluckring och förtjockning av GBM. Det förekommer också intramembranösa, elektrontäta depositioner och fusioner av podocyternas fotutskott (Hood et al, 2002b). Lamellering och fusion av fotutskott är vanligt, medan uppluckring är mindre framträdande (Hood et al, 2000). Vid undersökning av basalmembran i andra vävnader, till exempel cornea, retina, lunga och hud, har man funnit att dessa har ett ultrastrukturellt normalt utseende. Att man bara hittat onormala basalmembran i njuren hos bullterrier tros bero på att det defekta proteinet, åtminstone i större mängd, endast finns i njuren och är strukturellt viktigare där på grund av den lokala belastningen. (Hood et al, 2000)

Diagnos

Proteinuri, där proteinet nästan uteslutande utgörs av albumin, är en tillförlitlig och tidig indikation på defekta glomeruli och graden av proteinuri korrelerar med hur allvarliga histopatologiska förändringar man ser, framförallt gällande glomeruli (Hood et al, 1991). Alla former av Alports syndrom diagnosticeras med hjälp av de kliniska symtomen, där proteinuri oftast är det som upptäcks först, tillsammans med vetskapen om att sjukdomen finns i släkten eller genom att man ultrastrukturellt påvisar ett lamellerat GBM. (Hood et al, 2002a).

Behandling

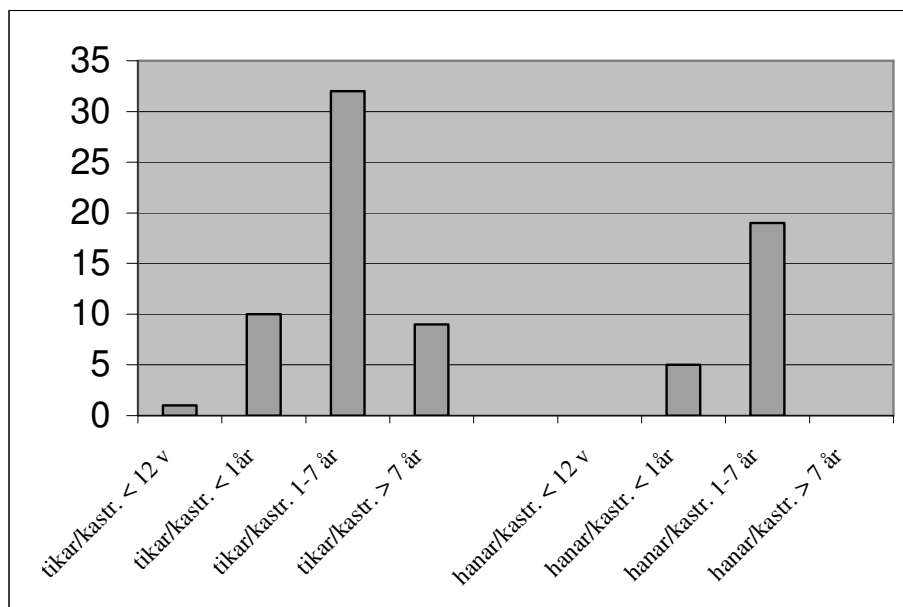
Någon specifik behandling mot hereditär nefrit finns inte. För att den sjuka hunden ska överleva så länge som möjligt krävs tidig diagnos, minskad proteinhalt i fodret samt vid behov reglering av blodtrycket med hjälp av ACE-hämmare (Lulich et al, 1996).

MATERIAL OCH METODER

Hundar

Urinprover

Urinprover från 76 bullterriers av olika kön och åldrar insamlades. Urinproverna bestod av spontankastad morgonurin, togs av hundägaren och skickades med post samma dag. Hundar i löp och dräktighet uteslöts på grund av risken för falskt förhöjt proteininnehåll i urinen. Prover från 12 kastrerade tikar, 40 intakta tikar, en kastrerad hane och 23 intakta hanar inkom och dessa var åldersfördelade enligt figur 2.



Figur 2. Ålders- och könsgruppering av 76 bullterriers från vilka urinprover inkommit till studien.

Befintligt material för histopatologisk och elektronmikroskopisk undersökning

Information om de hundar från vilka material för histopatologisk och/eller elektronmikroskopisk undersökning använts i studien visas i tabell 1. Materialet från hundarna 1-7 har vi fått tillgång till via Svenska Bullterrierklubben. Hundägarna själva har delat med sig av remissvar och histologiska preparat för att främja arbetet för en bättre hälsa inom rasen. Hund 8 deltog med urinprov i studien och var den enda som blev aktuell för njurbiopsi. Hund 9 och 10 är redan avlidna hundar vars ägare tagit kontakt direkt med oss och bidragit till studien med befintliga snitt för ljusmikroskopi. Informationen är hämtad från respektive hunds remiss till det laboratorium dit material för histopatologisk/elektronmikroskopisk undersökning sändes. Remissvaren kan ej anges på grund av att tillstånd till det ej medgivits, men i flera av fallen misstänktes hereditär nefrit. Tabell 1.

Tabell 1. Kliniska data från tio hundar från vilka snitt för ljus- och/eller elektronmikroskopi bedömts

Hund	Kön	Ålder	Kliniska symtom	Status	Njurvävnad från
1	Hane	6 mån	Sjuk sedan åtta veckors ålder. Kräkningar, dålig aptit, mager, nedsatt allmäntillstånd, förhöjda njurvärden.	Avlivad.	Obduktion.
2	Hane	9 år	Persistent förhöjd urinprotein/kreatininkvot, för övrigt inga kliniska symtom. Njurvärden och	Självdöd.	Obduktion.

			ultraljud utan anmärkning.		
3	Hon- kastrat	7 år	Persistent förhöjd urinprotein/kreatininkvot, inga andra symtom. Släktskap med hund 2.	Avlivad.	Obduktion.
4	Hane	4 år	Njursviktssymtom. Njursufficiens konstaterad nio månader tidigare.	Avlivad.	Obduktion.
5	Hane	7 år	Njursviktssymtom sedan tio månader. Små njurar på ultraljud.	Avlivad.	Obduktion.
6	Tik	4 år	Inga symtom på njursjukdom. Släktskap med hund 4.	Avlivad.	Obduktion.
7	Hane	4 år	Symtom på njursjukdom sedan två veckor. Små njurar på ultraljud. Hastig försämring. Släktskap med hund avlivad p.g.a. njursvikt.	Avlivad.	Obduktion.
8	Tik	6 år	Inga symtom på njursjukdom. Persisterande proteinuri. Små njurar på ultraljud.	Levande.	Biopsi.
9	Hane	20 mån	Symtom på njursvikt sedan en månad.	Avlivad.	Obduktion.
10	Tik	5 år	Symtom på njursjukdom. Förhöjd urinprotein/kreatininkvot. Släktskap med hund 9.	Avlivad.	Obduktion.

Undersökning av urinprover

Urindensiteten i varje urinprov kontrollerades med hjälp av en Reichert refraktometer och ett värde $\geq 1,030$ betecknades som normalt.

Varje urinprov kontrollerades också avseende protein- respektive hemoglobin-innehåll med Labstix urinstickor (tillverkare: Bayer Diagnostics). Hematuri ansågs föreligga om urinprovet visade sig innehålla spår av hemoglobin eller mer enligt Labstix. Provet ansågs då inte ge ett tillförlitligt proteinvärde på sticka, då blod ger ett falskt förhöjt proteininnehåll. Ägarna till de hundar som hade hematuri ombads lämna in ytterligare ett prov från sin hund och detta gjordes i de flesta fall inom tre-fyra veckor. Urinprov med protein enligt Labstix på 1+ eller mer frystes och lämnades vid ett senare tillfälle in till avdelningen för klinisk kemi, SLU, för analys av urinprotein/kreatininkvot. Urinprotein/kreatininkvot används istället för dygnsinsamling av urin som är praktiskt svårt att genomföra på djur (Chen et al, 2003).

Urinprotein kvantifierades med hjälp av en metod där absorptionsen mäts efter bindning av pyrogallolröd-molybdatkomplex till proteiner i provet. Urinkreatinin mättes med Jaffés reaktion där kreatinin i alkalisk miljö reagerar med pikrinsyra och ger en färgförändring. Även detta är en spektrofotometrisk metod där absorptionsen analyseras (analysapparat Konelab 30, Thermo Electron Oy, Finland). En urinprotein/kreatininkvot $>0,5$ anses onormal. Ägarna till de hundar som hade en kvot $>0,5$ i det första analyserade provet ombads skicka ett andra prov från sin hund vilket gjordes minst en månad efter det första provtagnings-tillfället.

Histopatologisk undersökning

Njurvävnad för ljusmikroskopi från hund 7 och 8 fixerades i formalin, trimmades, dehydrerades i en etanolserie, överfördes till xylen och bäddades in i paraffin. En mikrotom användes för att göra cirka $4\mu\text{m}$ tjocka snitt och dessa färgades sedan med hematoxylin och eosin (HE) samt periodic acid schiff (PAS). Den histopatologiska undersökningen för övriga hundar baserades på HE- och PAS-färgade snitt från redan befintligt formalinfixerat, paraffinbäddat material.

Utförande

Ljuskroskopisk undersökning utfördes på njursnitt från alla hundar utom hund 2 och 3. Snitten studerades med hjälp av ett Nikon Eclipse E600-mikroskop. För bedömning av glomeruli studerades fem fält i 10x förstoring. Tubuli och interstitium studerades i 10 fält i 10x förstoring. De förändringar som studerades var cystiskt dilaterade Bowmans kapslar, förtjockade Bowmans kapslar, stora glomeruli, hypercellulärt/förtjockat mesangium, fetala glomeruli, fibros/tubuliatrofi, inflammatoriska celler, förtjockat basalmembran i tubuli, tubulidilatation, proteininnehåll i tubuli och hyperplastiskt tubuliepitel. Det noterades om olika förändringar förekom eller inte.

Transmissionselektronmikroskopi

Mycket små bitar av njurvävnad från hund 7 och 8 fixerades i en blandning av hälften 3 %-ig glutaraldehyd och hälften 3%-ig paraformaldehyd. Före inbäddning utfördes tvättning med fosfatbuffert, ny fixering i osmiumtetroxid med efterföljande tvättning i fosfatbuffert och dehydrering av vävnaden med hjälp av en etanolserie med början på 30%. Därefter bäddades vävnaden in i plast, grovsnittades i en mikrotom med hjälp av en glaskniv och färgades med toluidinblått. Grovsnitten undersöktes i ljusmikroskop för att välja ut områden med glomeruli för finsnittning vilken sedan utfördes i en ultramikrotom med hjälp av en diamantkniv. Finsnitten, ca 60-70 nm tjocka, placerades på så kallade grids och kontrasterades med först uranylacetat och därefter blycitrat. Njurvävnaden, vilken bestod av glomeruli, i dessa grids undersöktes sedan med ett transmissions-elektronmikroskop (Philips EM 420). Beträffande det redan befintliga materialet för elektronmikroskopisk undersökning var vävnaden från hundarna 3 och 6 fixerad i en blandning av glutaraldehyd och paraformaldehyd enligt ovan, medan vävnaden från hundarna 1 och 4 var fixerad i formalin (vilket inte är optimalt för elektronmikroskopi). För hundarna 2 och 5 var det osäkert vilken fixering som använts. För hundarna 1-6 var vävnaden sedan hanterad och snitt framställda enligt beskrivningen ovan. Från hundarna 9 och 10 fanns inget material tillgängligt för elektronmikroskopi.

RESULTAT

Proteinuri

Enligt Labstix hade sex kastrerade tikar, 20 intakta tikar och 15 intakta hanar proteininnehåll i urinen motsvarande 1+ eller mer. Två kastrerade tikar, en intakt tik och två intakta hanar hade hematuri enligt Labstix vid två olika provtagnings-tillfällen och rekommenderades veterinärundersökning. Tre tikar hade hematuri i det första provet, men lämnade inget uppföljande prov. Totalt var det 41 av 76 hundar som hade proteinuri enligt urinsticka och åtta stycken som hade hematuri (tabell 2).

Tabell 2. Proteinuri- och hematuriförekomst enligt Labstix hos 76 hundar fördelade på kön och åldrar

	Intakta tikar <12 v Antal (%)	Intakta tikar >12 v Antal (%)	Kastr. tikar >12 v Antal (%)	Intakta hanar >12 v Antal (%)	Kastr. hanar >12 v Antal (%)	Totalt Antal (%)
Proteinuri vid första provtagningsstillfället	0 (-)	20 (51)	6 (50)	15 (65)	0 (-)	41 (54)
Ej proteinuri	1 (100)	15 (38)	4 (33)	6 (26)	1 (100)	27 (35)
Hematuri i två prov	0 (-)	1 (3)	2 (17)	2 (9)	0 (-)	5 (7)
Hematuri, inget uppföljande prov togs	0 (-)	3 (8)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	3 (4)
Totalt	1	39	12	23	1	76

Av de 41 hundar som hade proteinuri enligt urinsticka sågs en onormal urinprotein/kreatininkvot hos totalt fem hundar (12%), två intakta tikar, en kastrerad tik och två hanar (tabell 3).

Tabell 3. Urinprotein/kreatininkvot vid två tillfällen hos fem hundar med proteinuri

Urinprotein/kreatininkvot	Kastrerad tik 12 år	Tik 11,5 år	Tik 6 år	Hane 6 år	Hane 4 år
Prov 1	2,64	0,95	1,08	0,56	0,85
Prov 2	2,22	0,77	0,93	0,45	0,32

Urindensitet

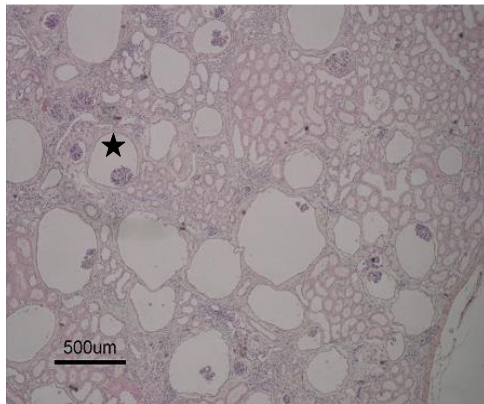
Av de tre hundarna med persisterande proteinuri, det vill säga en urinprotein/-kreatininkvot $>0,5$ i två prover tagna med minst en månads mellanrum, hade endast den tolvåriga kastrerade tiken tecken på nedsatt förmåga att koncentrera sin urin. Urindensiteten var 1,015 i det första provet och 1,014 i det uppföljande provet, men något törstprov för verifiering av resultatet genomfördes inte på någon av de i studien ingående hundarna. Hanarna med proteinuri i det första provet hade båda normal urindensitet, $>1,030$ vid uppföljande provtagning. Utöver dessa var det sex hundar i studien som hade en urindensitet som låg mellan 1,028 och 1,017 men utan proteinuri. Utan att ha gjort något törstprov antogs dessa hundar vara kliniskt friska och urindensiteten ligga inom normalvariationen. En ettårig tik hade en urindensitet på 1,009 i båda sina prov men då proven innehöll blod rekommenderades veterinärundersökning och hunden utreddes inte vidare avseende proteinuri i denna studie.

Histopatologi

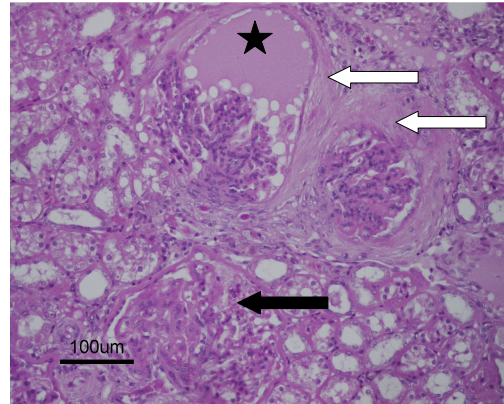
Resultatet av den histopatologiska undersökningen summeras i tabell 4. Hos en av de undersökta hundarna, hund 8, från vilken det endast fanns en biopsi, fanns inga glomeruli och endast en liten mängd tubuliinterstitiell vävnad tillgänglig för bedömning, varför histopatologiska fynd, till största delen saknas från den hunden. Från hund 2 och 3 fanns inga snitt för ljusmikroskopi och de är därför ej inkluderade i tabellen nedan. Dilaterade Bowmans kapslar med eller utan synlig glomerulus förekom hos flertalet hundar (figur 3). Hypercellularitet i mesangiet och mesangieförtjockning var också vanligt förekommande. Förtjockad Bowmans kapsel fanns hos samtliga hundar och denna förtjockning bestod av en kombination av periglomerulär fibros och förtjockat basalmembran (figur 4). Fetala glomeruli observerades hos tre hundar. Hos några hundar noterades glomeruli med större kapillärnystan än normalt (figur 5). Interstitiell fibros, ofta i form av radiära stråk genom både bark och märg, med varierande grad av tubulär atrofi sågs hos alla hundarna (figur 6). Enstaka foci av inflammatoriska celler fanns hos alla utom två hundar (figur 7). Dilaterade tubuli med proteinhaltigt innehåll sågs hos alla utom en hund och ett onormalt flerradigt cylinderepitel i tubuli förekom hos fem av hundarna (figur 8).

Tabell 4. Ljasmikroskopiska fynd från njurvävnad från åtta bullterriers

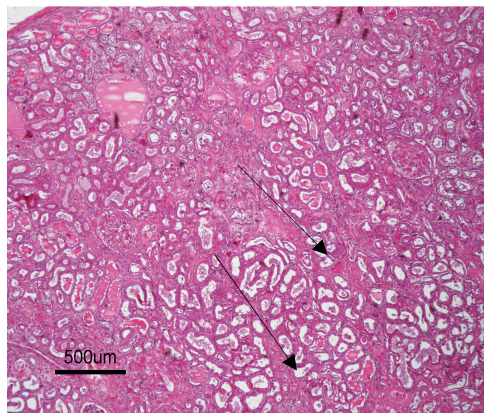
Förändringar (X = förekommer, - = förekommer ej, e.u. =kunde ej undersökas)	Hund 1	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8	Hund 9	Hund 10
<i>Glomerulära förändringar</i>								
Cystiskt dilaterade Bowmans kapslar	X	X	-	-	X	e.u.	X	X
Förtjockad Bowmans kapsel	X	X	X	X	X	e.u.	X	X
Stora glomeruli	-	X	X	-	-	e.u.	X	-
Hypercellulärt mesangium/ mesangieförtjockning	X	X	-	X	X	e.u.	X	X
Fetala glomeruli	X	X	-	-	-	e.u.	X	-
<i>Tubulära och interstitiella förändringar</i>								
Fibros/tubuliatrofi	X	X	X	X	X	e.u.	X	X
Fokala interstitiella infiltrat av inflammatoriska celler	X	X	X	X	-	-	X	X
Förtjockat tubulibasalmembran	-	-	-	X	X	-	-	X
Tubulidilatation	X	X	X	-	X	X	X	X
Proteininnehåll i tubuli	X	X	X	-	X	X	X	X
Flerradigt cylinderepitel i tubuli	-	X	X	-	X	-	X	X



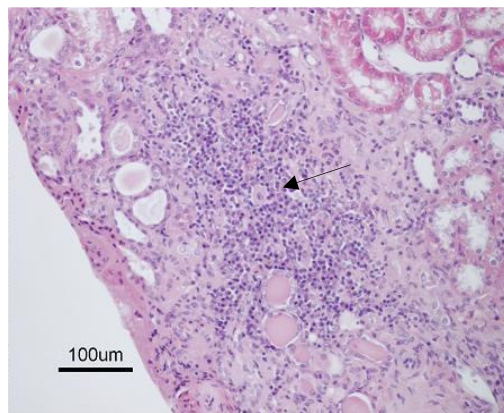
Figur 3. Cystiskt dilaterade Bowmans kapslar (stjärna).



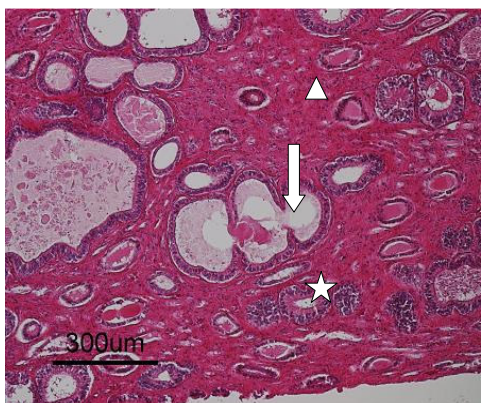
Figur 4. Glomeruli av olika utseende; en med dilaterad Bowmans kapsel (stjärna), två med periglomerulär fibros (vit pil) och en normal (svart pil).



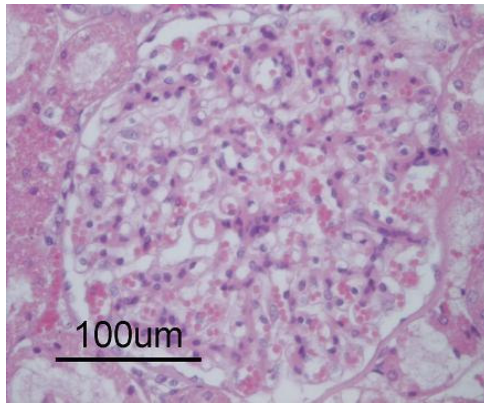
Figur 6. Radiär fibros i stråk från barken ner mot märgen (pilar).



Figur 7. Inflammatoriskt fokus med i huvudsak mononukleära celler (pil).



Figur 8. Dilaterade tubuli med proteininnehåll (pil) och ett flerradigt cylinderepitel (stjärna) Tubulär atrofi och fibros (triangel).



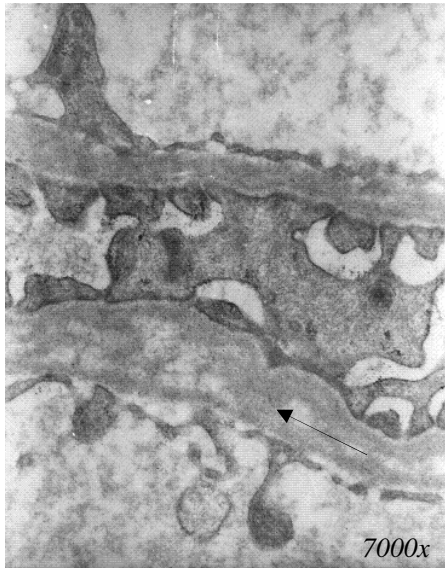
Figur 5. Stort glomerulinystan.

Ultrastruktur

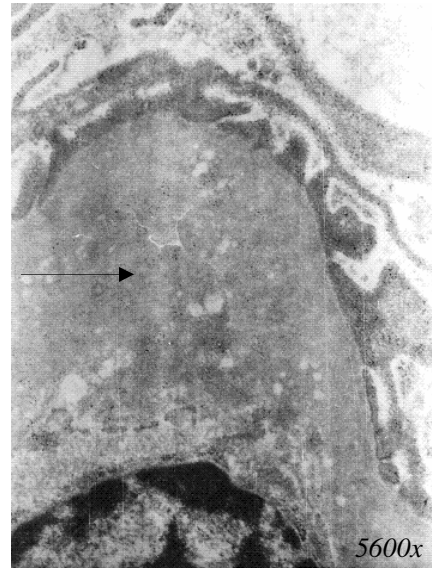
På grund av förändringar som troligtvis orsakats av autolys var ultrastrukturella strukturer omöjliga att identifiera i vävnaden från hund 7, medan njurvävnaden från de resterande hundarna 1-6 samt 8, trots variationer avseende fixering, kunde bedömas elektronmikroskopiskt. Hos samtliga hundar sågs förändringar som är typiska för hereditär nefrit, såsom tydlig förtjockning och uppluckring/lamellering av GBM (figur 9A och B). Hos alla hundar utom hund 1 kunde man se fusioner av podocyternas fotutskott (figur 10). Elektrontäta depositioner i GBM förekom i några fall (figur 11). En sammanställning av de elektronmikroskopiska förändringarna ses i tabell 5.

Tabell 5. Elektronmikroskopiska fynd från njurvävnad från sju bullterrier

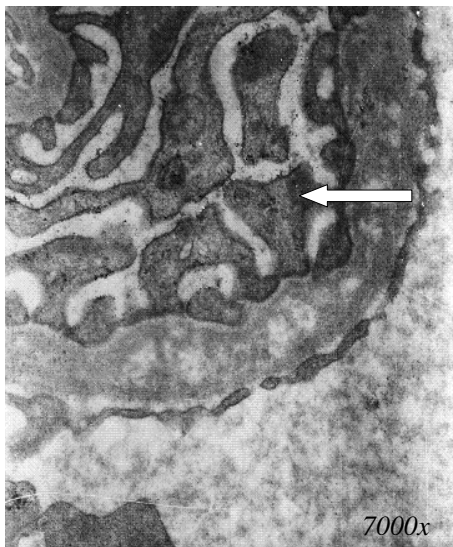
Förändringar (X = förekommer, - = förekommer ej)	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 8
<i>Det glomerulära basalmembranet</i>							
Förtjockning	X	X	X	X	X	X	X
Uppluckring/lamellering	X	X	X	X	X	X	X
Elektrontäta depositioner	-	X	X	X	-	-	X
<i>Övrigt</i>							
Fusioner av fotutskott	-	X	X	X	-	X	X



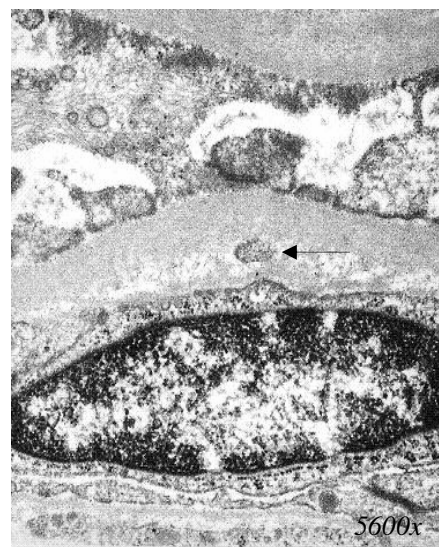
Figur 9A. Förtjockning och lamellering/uppluckring av GBM (pil).



Figur 9B. Förtjockning och uppluckring av GBM (pil).



Figur 10. Fusioner av fotutskott (pil) samt GBM med tydlig uppluckring.



Figur 11. Elektrontät deposition i uppluckrad del av GBM (pil).

DISKUSSION

Den svenska bullterrierpopulationen beräknas till 700-800 hundar, vilket baseras på registreringsuppgifter från Svenska Kennelklubben, Jordbruksverket och Svenska Bullterrierklubben från år 2005. De 76 hundarna i studien motsvarar således ungefär tio procent av totalantalet bullterrier i Sverige. Prover från ett större antal hundar och då framförallt från misstänkta släktled, med utgångspunkt från de hundar som diagnostiserats tidigare, skulle bringa ytterligare klarhet i förekomsten av hereditär nefrit hos svenska bullterriers.

Ålder har visat sig ha betydelse för proteinuri hos bullterrier så till vida att proteinutsöndringen i urinen ökar med åldern, vilket kan förklaras av att hereditär nefrit hos bullterrier är en kronisk och progressiv sjukdom (Hood et al, 1991). De tre hundarna i studien med persisterande proteinuri var 6, 11,5 respektive 12 år, vilket verkar stämma överens med sjukdomens kroniska och progredierande förlopp. Dock var det en något sned åldersfördelning på de deltagande hundarna, då det var färre hundar under ett års ålder än över och med tanke på att sjukdomen är ärftlig och har setts ge upphov till njursvikt även hos yngre hundar hade det varit önskvärt med fler hundar i yngre åldrar.

Kön har visat sig vara utan betydelse för förekomst av proteinutsöndring i urinen (Hood et al, 1991). Sjukdomen nedärvs autosomt dominant och därmed drabbas tikar och hanar i ungefär lika stor utsträckning. Att det var övervägande tikar som deltog i studien borde således inte ha spelat någon avgörande roll för resultaten. Av de fem hundarna med proteinuri i första provet var två hanar och tre tikar, medan det bara var de tre tikarna som konstaterades ha persisterande proteinuri. Detta kan dock på grund av den sneda könsfördelningen på de undersökta hundarna likaväl antas spegla skillnader i antal deltagare per kön som en könsskillnad.

Drygt hälften av de deltagande hundarna hade ett proteininnehåll motsvarande 1+ eller mer enligt Labstix medan endast fem av dessa hade proteinuri enligt definitionen urinprotein/kreatininkvot $>0,5$. Av dessa fem hundar var det endast tre som hade persisterande proteinuri. De tre med persisterande proteinuri hade 2+ på urinsticka medan de två med proteinuri endast i det första provet hade 1+ på urinsticka. Dock fanns det hundar i studien som hade 2+ på sticka och en urinprotein/kreatininkvot under 0,5 och även hundar med 1+ enligt Labstix och strax under 0,5 i kvot. Av detta kan man dra slutsatsen att proteininnehållet enligt urinsticka kan användas som vägledning medan urinprotein/kreatininkvoten ger ett mer tillförlitligt resultat.

I litteraturen förekommer olika värden för vad som anses vara en onormal kvot och därmed vad som klassas som proteinuri men det har visat sig att en urinprotein/kreatininkvot $\geq 0,3$ svarar mot de typiska histologiska förändringar som setts vid hereditär nefrit hos bullterrier. (Hood et al, 2002b)

Proteinuri hos bullterrier indikerar en glomerulär dysfunktion och anses vara en tidig indikator på subklinisk njursjukdom hos denna ras (Hood et al, 1991). Det krävs dock en kraftig och persisterande proteinuri för att man säkert ska kunna dra en sådan slutsats. De tre hundarna med persisterande proteinuri i denna studie

hade urinprotein/kreatininkvoter som låg tydligt över gränsvärdet 0,5 vilket alltså skulle kunna indikera glomerulär dysfunktion. Dessutom får inte hematuri eller pyuri föreligga om man ska kunna diagnosticera glomerulär dysfunktion via proteinuri. Det finns studier som visar att en urinvägsinfektion i nedre urinvägarna eller en blödning kraftigt ökar urinprotein/kreatininkvoten, medan det finns andra studier som påstår motsatsen (Hood et al, 1991).

Hematuri är inte lika framträdande som proteinuri hos hundar med hereditär nefrit (Lees et al, 1999). Fem hundar i denna studie visade hematuri vid två olika provtagningsstillfällen. Ägarna till tre av dessa lämnade besked att deras veterinär satt in behandling mot urinvägsinfektion. Två hundar med hematuri i det första provet, och där man inte lämnade in ett andra prov, hade börjat löpa. Enligt litteraturen är hematuri vanligare förekommande hos bullterrier med proteinuri än de utan. Knappt hälften av de undersökta hundarna med proteinuri i en studie hade samtidig hematuri (Hood et al, 1995). Hos hundar med samtidig hematuri och proteinuri får man inte glömma att hemoglobin är ett protein och när det finns i urinen ger det följaktligen utslag för proteinuri. Uppföljande prover hos hundar med samtidig hematuri och proteinuri är således viktiga för att skilja falskt positiva proteinurieresultat på grund av hemoglobinuri från det ökade innehållet av framförallt albumin i urinen som ses vid hereditär nefrit.

Av de deltagande hundarna fanns en med så låg densitet, vid båda provtillfällena, att man skulle kunna misstänka en nedsatt förmåga att koncentrera urinen. Inga törstprover gjordes och därför kan inga slutsatser dras om detta. Dock har tidigare studier visat att drabbade bullterriers har sämre förmåga att koncentrera sin urin än normala hundar. Detta verkar däremot inte ha något samband med hur stor mängd protein de utsöndrar, utan är sannolikt snarare relaterat till graden av tubulointerstitiell skada (Hood et al, 1991).

Hos flertalet hundar sågs cystiskt dilaterade Bowmans kapslar med små eller ej synliga glomeruli. Ett snitt för ljusmikroskopi är 3-4 µm tjockt och en normal glomerulus har en diameter på ungefär 190 µm. Därför är det tänkbart att ett kärlnystan i en kraftigt dilaterad Bowmans kapsel inte kommer med i snittet och därför ser ut att saknas. Denna tänkbara snittartefakt har dock inte diskuterats i litteraturen utan där har istället dilatation av Bowmans kapsel utan synlig glomerulus eller med en liten glomerulus tolkats som en frånvarande eller atrofisk glomerulus (Hood et al, 2002a). De Bowmans kapslar som varit tomma i denna studie har betecknats som "cystiskt dilaterade Bowmans kapslar" då det inte kunnat fastställas om den dilaterade kapseln verkligen var tom eller om glomerulinnystan bara inte kommit med i snittet. I de snitt där många tomma kapslar påvisats ökar dock sannolikheten för att det verkligen rör sig om glomerulär atrofi och inte en snittartefakt.

I snitten från några av hundarna i den här studien sågs fetala glomeruli, vilket beskrevs för första gången vid den autosomala formen av sjukdomen hos bullterrier i Australien (Hood et al, 2002a). Förklaringen till förekomsten av kvarstående fetala glomeruli hos vuxna hundar tros vara att hereditär nefrit hos bullterrier leder till en avstannad utveckling. Såväl bark som märg är dock välutvecklade varför det verkar som om en normal utveckling sker samtidigt. De onormalt stora glomerulinnystan, som i viss utsträckning förekom i den här studien

av svenska bullterriers, har även påvisats tidigare i andra studier, men hur denna separata glomerulipopulation med större nystan bildas är inte klarlagt. (Hood et al, 2002a) Renal dysplasi är en annan medfödd utvecklingsrubbnig i njurarna där man ser fetala/outvecklade glomeruli och tubuli, inflammatoriska förändringar och fibros med sekundära skador som inkluderar kompensatorisk hypertrofi och hyperplasi av nefronet (Picut et al, 1987). Det är inte utrett, men man kan tänka sig att de onormalt stora glomerulinytan som ibland ses vid hereditär nefrit kan vara en kompensatorisk effekt liknande den vid renal dysplasi.

Det händer att diagnosen hereditär nefrit ställts på ljusmikroskopiska fynd, men studier har visat att de ljusmikroskopiska fynden är ospecifika och inte räcker för att ställa en säker diagnos (Hood et al, 2002a). Immunmedierad glomerulonefrit kännetecknas liksom hereditär nefrit av proteinuri och sjukdomarna har även flera likheter på ljusmikroskopisk nivå. Den membranoproliferativa formen av glomerulonefrit karakteriseras av både hypercellularitet och förtjockat basalmembran och/eller ökat mesangium i glomeruli, medan den membranösa formen domineras av glomerulär basalmembransförtjockning (McGavin et al, 2001). Denna typ av förändringar påvisades också hos hundarna i den här studien, men de uppvisade också för hereditär nefrit typiska ultrastrukturella förändringar, vilka inte ses vid glomerulonefrit. Immunmedierad glomerulonefrit utgör därför en differentialdiagnos till hereditär nefrit såväl kliniskt som på ljusmikroskopisk nivå.

Den i litteraturen beskrivna, typiska ultrastrukturella avvikelser vid hereditär nefrit hos bullterrier, uppluckring/lamellering av GBM (Hood et al, 2000) hittades med hjälp av transmissionselektronmikroskopi i olika grad i njurarna från samtliga bedömda i studien deltagande hundar. Lindrigare förändringar skulle kunna tyda på ett tidigt stadium av sjukdomen. Hos hundar med den könsbundet nedärvda varianten av sjukdomen har man upp till fyra års ålder sett lamellering av GBM med tydlig uppluckring och ibland distinkt indelning i lager, medan lamelleringen hos äldre hundar varit mer komprimerad, d.v.s. mindre lucker och ej lika tydliga lager (Baumal et al, 1991 & Hood et al, 2000). Hos fallen i den aktuella studien har ingen sådan tendens som kunnat korreleras till åldern setts, utan uppluckringen och lamelleringen hade ett liknande utseende hos alla hundarna. Inga slutsatser avseende detta kan dock dras, då endast material från sju hundar studerats ultrastrukturellt. Fusioner av fototuskott förekom i de flesta snitt och elektrontäta depositioner sågs i ett fåtal fall, vilket också överensstämmer med fynd som beskrivits i tidigare studier (Hood et al, 2000).

Slutsats

Den här studien visade att persisterande proteinuri förekommer bland svenska bullterriers. Påvisade histopatologiska förändringar var ospecifika och därför inte diagnostiska, men de överensstämde väl med dem som tidigare beskrivits för sjukdomen hos den här rasen. Ultrastrukturella förändringar i GBM typiska för hereditär nefrit påvisades hos samtliga sju hundar i studien som undersöktes elektronmikroskopiskt.

Sammantaget tyder resultaten på att hereditär nefrit förekommer hos bullterrier i Sverige och kan diagnosticeras med hjälp av klinisk bild och ljusmikroskopi tillsammans med transmissionselektronmikroskopi. För att kunna dra säkra

slutsatser om sjukdomens utbredning i landet behövs prover från fler hundar och då särskilt från släktled där sjukdomen tidigare diagnosticerats.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Baumal R., Thorner P., Valli V.E., McInnes R., Marrano P., Jacobs R., Binnington A. & Bloedow A.G. (1991) Renal disease in carrier female dogs with X-linked hereditary nephritis. Implications for female patients with this disease. *Am J Pathol* Oct; 139(4): 751-764.
- Blaise, P., Delanaye P., Martalo O., Pierard G.E., Rorive G. & Galand A. (2003) Anterior lenticonus: diagnostic aid in Alport syndrome. *J Fr Ophtalmol* Dec; 26(10): 1075-1082.
- Chen D., Jefferson B., Harvey S.J., Zheng K., Gartley C.J., Jacobs R.M. & Thorner P.S. (2003) Cyclosporine A slows the Progressive Renal Disease of Alport Syndrome (X-linked Hereditary Nephritis): Results from a Canine Model. *J Am Soc Nephrol* 14: 690-698.
- Ciccarese M., Casu D., Wong F.K., Faedda R., Arvidsson S., Tonolo G., Luthman H. & Satta A. (2001) Identification of a new mutation in the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen gene in a family with autosomal dominant Alport syndrome and hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 16: 2008-2012
- Colville D.J. & Savige J. (1997) Alport syndrome. A review of the ocular manifestations. *Ophthalmic Genet.* Dec; 18(4): 161-173.
- Cook A.K. & Cowgill L.D. (1996) Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *J Am Anim Hosp Assoc* Jul-Aug; 32(4): 313-322.
- DiBartola S.P., Spaulding G.L., Chew D.J. & Lewis R.M. (1980) Urinary protein excretion and immunopathologic findings in dogs with glomerular disease. *J Am Vet Med Assoc.* Jul 1; 177(1): 73-77.
- Grodecki K.M., Gains M.J., Baumal R., Osmond D.H., Cotter B., Valli V.E.O. & Jacobs R.M. (1997) Treatment of X-linked hereditary nephritis in Samoyed dogs with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor. *J Comp Pathol* 117: 209-225.
- Harvey S.J., Mount R., Sado Y., Naito I., Ninomiya Y., Harrison R., Jefferson B., Jacobs R. & Thorner P.S. (2001) The inner ear of dogs with X-linked nephritis provides clues to the pathogenesis of hearing loss in X-linked Alport syndrome. *Am J Pathol* Sep; 159(3): 1097-1104.

- Harvey S.J., Zheng K., Sado Y., Naito I., Ninomiya Y., Jacobs R.M., Hudson B.G. & Thorner P.S. (1998) Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int Dec*; 54(6): 1857-1866.
- Hood J.C., Dowling J., Bertram J.F., Young R.J., Huxtable C., Robinson W. & Savage J. (2002a) Correlation of histopathological features and renal impairment in autosomal dominant Alport syndrome in Bull terriers. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1897-1908.
- Hood J.C., Huxtable C., Naito I., Smith C., Sinclair R. & Savage J. (2002b) A novel model of autosomal dominant Alport syndrome in Dalmatian dogs. *Nephrol Dial Transplant* 17: 2094-2098.
- Hood J.C., Robinson W.F., Clark W.T., Sutherland R.J., James I., Thomas M.A.B. & Huxtable C.R. (1991) Proteinuria as an indicator of early renal disease in bull terriers with hereditary nephritis. *J Small Anim Pract* 32: 241-248.
- Hood J.C., Robinson W.F., Huxtable C.R., Bradley J.S., Sutherland R.J. & Thomas M.A. (1990) Hereditary nephritis in the bull terrier: evidence for inheritance by an autosomal dominant gene. *Vet Rec May* 5; 126(18): 456-459.
- Hood J.C., Savage J., Hendtlass A., Kleppel M.M., Huxtable C.R. & Robinson W.F. (1995) Bull terrier hereditary nephritis: A model for autosomal dominant Alport syndrome. *Kidney Int* 47: 758-765.
- Hood J.C., Savage J., Seymour A.E., Dowling J., Martinello P., Colville D., Sinclair R., Naito I., Jennings G. & Huxtable C. (2000) Ultrastructural appearance of renal and other basement membranes in the bull terrier model of autosomal dominant hereditary nephritis. *Am J Kidney Dis Aug*; 36(2): 378-91.
- Hägglund R. (2001) Bullterrierns historia. *Bullterriern i våra hjärtan* 1st ed: 26.
- Junqueira L.C., Carneiro J. & Kelley RO. (1998) *Basic Histology* 9th ed: 360-364.
- Lees G.E. (1996) Congenital renal diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract Nov*; 26(6): 1379-1399.
- Lees G.E., Helman R.G., Kashtan C.E., Michael A.F., Homco L.D., Millichamp N.J., Camacho Z.T., Templeton J.W., Ninomiya Y., Sado Y., Naito I. & Kim Y. (1999) New form of X-linked dominant hereditary nephritis in dogs. *Am J Vet Res* 60; 3: 373-383.
- Lees G.E., Helman R.G., Kashtan C.E., Michael A.F., Homco L.D., Millichamp N.J., Ninomiya Y., Sado Y., Naito I. & Kim Y. (1998) A model of autosomal recessive Alport-syndrome in English Cocker Spaniel dogs. *Kidney Int* 54: 706-719.

- Lees G.E., Wilson P.D., Helman R.G., Homco L.D. & Frey MS. (1997) Glomerular ultrastructural findings similar to hereditary nephritis in 4 English Cocker Spaniels. *J Vet Intern Med* 11: 80-85.
- Lulich J.P., Osborne C.A. & Polzin D.J. (1996) Diagnosis and long-term management of protein-losing glomerulonephropathy. A 5-year case-based approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract Nov*; 26(6): 1401-1416.
- McGavin M.D., Carlton W.W. & Zachary J.F. (2001) Thomson's Special Veterinary Pathology 236-257.
- O'Leary C.A., Ghoddusi M. & Huxtable C.R. (2002) Renal pathology of polycystic kidney disease and concurrent hereditary nephritis in Bull Terriers. *Aust Vet J Jun*; 80(6): 353-361.
- Picut C.A. & Lewis R.M. (1987) Microscopic features of canine renal dysplasia. *Vet Pathol Mar*; 24(2): 156-63.
- Robinson W.F., Shaw S.E., Stanley B., Huxtable C.R., Watson A.D., Friend S.E. & Mitten R. (1989) Chronic renal disease in bull terriers. *Aust Vet J Jul*; 66(7): 193-195.
- Valli V.E., Bauman R., Thorner P., Jacobs R., Marrano P., Davies C., Qizilbach B. & Clarke H. (1991) *Lab Invest Jul*; 65(1): 67-73.
- Wright N.G., Fisher E.W., Morrison W.I., Thomson W.B. & Nash A.S. (1976) Chronic renal failure in dogs: a comparative clinical and morphological study of chronic glomerulonephritis and chronic interstitial nephritis. *Vet Rec Apr 10*; 98(15): 288-93.

TACK

Ett stort tack vill jag rikta till min handledare Astrid Hoppe, biträdande handledare Maria Hurst och Tapio Nikkilä för allt stöd och alla goda råd. Tack också till Sivert Bjurström Biovet, Lena Grundén och Svenska Bullterrierklubben. Min familj, Jörgen och Rasmus, har ställt upp med ovärderlig hjälp hemma vilket jag uppskattat enormt. Sist men inte minst vill jag tacka alla bullterrierägare som skickade in urinprover - utan er hade studien inte gått att genomföra!

Marika Gunnarsson, Uppsala. November 2006.